

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2000年12月7日 (07.12.2000)

PCT

(10)国際公開番号
WO 00/72873 A1

(51)国際特許分類: A61K 38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

(74)代理人: 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.);
〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル
5階 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号:

PCT/JP00/03506

(22)国際出願日:

2000年5月31日 (31.05.2000)

(25)国際出願の言語:

日本語

(26)国際公開の言語:

日本語

(30)優先権データ:

特願平11/151769 1999年5月31日 (31.05.1999) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内二
丁目5番2号 Tokyo (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 千葉雅俊 (CHIBA,
Masatoshi) [JP/JP]; 〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂
山14 三菱化学株式会社 鹿島事業所内 Ibaraki (JP).

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

(54)Title: FREEZE DRIED HGF PREPARATIONS

(54)発明の名称: HGF凍結乾燥製剤

(57)Abstract: Freeze dried preparations containing hepatocyte growth factor (HGF), a stabilizer such as arginine or lysine, sodium chloride and a buffer. These preparations, which are produced from an aqueous solution containing less than 5 mg/mL of HGF and/or to be used in producing an aqueous solution containing less than 5 mg/mL of HGF, are excellent in storage stability.

(57)要約:

WO 00/72873 A1

肝実質細胞増殖因子 (HGF)、アルギニン又はリジンなどの安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液から調製され、及び/又は再溶解により肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液を調製するための保存安定性に優れた製剤。

明細書

HGF凍結乾燥製剤

技術分野

本発明は、肝実質細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤に関する。

背景技術

肝実質細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor : 以下、本明細書において「HGF」と略す場合がある。) は肝実質細胞の増殖活性を有するタンパク質であり、種々の動物種においてその存在が知られており、異なったアミノ酸配列を有するものが報告されている。ヒト肝実質細胞増殖因子 (以下、本明細書において「h HGF」と略す場合がある。) は、大工原らにより劇症肝炎患者血漿より見出され (特開昭 63-22526 号公報)、その後、喜多村らにより h HGF タンパク質のアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子 (cDNA) 配列が明らかにされた (特開平 3-72883 号公報)。さらにこの cDNA を用いた h HGF タンパク質の生産方法及び形質転換体が報告されるにいたり (特開平 3-285693 号公報)、h HGF タンパク質の大量生産が可能となり医薬品としての応用が期待されている。

h HGF は糖タンパク質の一種であり、分子量は非還元状態では約 80~90 kDa、還元状態では約 52~56 kDa の α サブユニットと約 30~36 kDa の β サブユニットからなるヘテロダイマーである。h HGF は、肝細胞増殖因子としての活性のほか、スキャター因子 (scatter factor ; SF) 活性、腎臓尿細管上皮細胞増殖因子活性、損傷組織修復因子活性、血管内皮細胞増殖因子活性など多様な生物活性を有しており、肝臓疾患治療薬、腎臓疾患治療薬、脳神経障害治療剤、育毛促進剤、創傷治療薬、抗腫瘍治療薬などの医薬としての開発が期待されている。

HGF の製剤については、W090/10651 公報、特開平 6-247872 号公報、及び特開平 9-25241 号公報に記載がある。上記 W090/10651 公報には、HGF と比較して

アミノ酸5残基が欠失したデリーションタイプのHGF (TCF) の水溶液製剤が開示されており、アルブミン、ヒト血清、ゼラチン、ソルビトール、マンニトール、キシリトール等がTCFを水溶液中で安定化することが教示されている。特開平6-247872号公報には、塩基性アミノ酸等とTCFを共存させることにより、TCFを5～10mg/mLの高濃度に含有させた注射剤が開示されている。この刊行物にはTCFの水溶液での溶解性が言及されており、TCFを高濃度に含有させた水溶液が開示されているが、塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン）は注射液剤の「溶解補助剤」として用いられている。

しかしながら、HGFの水溶液製剤は、中性pHにおいて溶解性が急激に低下し、低温又は室温で数日間保存すると凝集、白濁、ゲル化が進行するという問題を有している。また、類縁体・重合体が形成されるなど物理化学的安定性が低く、生物活性が低下するなど製剤安定性が低く、生物学的活性の点からも長期間の保存には適しない。さらに、HGFの水溶液製剤は、振とう攪拌による泡立ち等により凝集、白濁、ゲル化を引き起こし、長期間の保存及び流通運搬の際に製剤品質の低下、薬効の低減がもたらされる。このため、HGFの製剤としては、凍結乾燥製剤が好適である。

特開平9-25241号公報にはHGF (TCF) の凍結乾燥製剤が開示されているが、本発明とは異なり、クエン酸塩を緩衝液として用い、安定化剤としてグリシン、アラニン、ソルビトール、マンニトール等を用いることにより、長期間にわたり安定な高濃度HGF (TCF) 凍結乾燥製剤を提供できることが教示されている。しかしながら、この凍結乾燥製剤は、緩衝液としてクエン酸を用いるために再溶解後のpHが酸性条件であり、また溶液の浸透圧が高いために、注射投与の際の痛み、投与部位での炎症反応、溶血現象を誘起するなどの問題を有している。

また、HGFは極めて生理活性の強い物質であり、医薬として使用する場合には非常に低濃度の製剤として臨床の場に提供される必要があるが、本発明者らの研究によれば、特開平9-25241号公報に記載されたグリシン又はアラニンを含む

HGF (TCF) の凍結乾燥製剤では、高濃度のHGFを含む水溶液から製造した凍結乾燥製剤は保存時に重合体の生成は少ないものの、臨床適用にあたり望まれる低濃度のHGF（一般的にはHGFが5 mg/mL未満の濃度であり、例えば2 mg/mL程度である。）を含む水溶液をグリシン又はアラニンの存在下で凍結乾燥した製剤は保存時に重合体の生成が認められた。従って、特開平9-25241号公報に記載されたグリシン又はアラニンは高濃度のHGFを凍結乾燥する場合の安定化剤としては有用であるものの、低濃度のHGFを凍結乾燥する場合の安定化剤としては不十分であり、低濃度のHGFを含む水溶液から重合体の生成しにくい、長期保存安定性に優れた凍結乾燥製剤を製造する方法の開発が求められていた。

発明の開示

本発明の課題は、低濃度のHGFを含む水溶液を調製可能なHGF凍結乾燥製剤を提供することにある。より具体的には、保存安定性に優れ、再溶解時に凝集、白濁、ゲル化などを生じないHGF凍結乾燥製剤を提供することが本発明の課題である。また、凍結乾燥時に良好なケーキ形成性を有し、再溶解性に優れた凍結乾燥製剤を提供することも本発明の課題である。さらに、注射剤として望ましいpHおよび浸透圧比を有する上記製剤を提供することも本発明の課題である。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、HGFの濃度を5 mg/mL未満として安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤の存在下で凍結乾燥を行うと、ケーキ形成性、溶解性、長期保存安定性の良好な凍結乾燥製剤を製造することができること、及び該凍結乾燥製剤の製造時及び凍結乾燥製剤の保存時に重合体が生成せず、該凍結乾燥製剤が極めて高い安定性を有していることを見出した。また、この凍結乾燥製剤から調製された水溶液には凝集、白濁、ゲル化などが生じないこと、及びこのように希薄なHGFを含む水溶液が臨床的に十分な薬効を発揮できることも見出した。本発明は、上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明により、

肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液から調製される製剤；
肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、再溶解により肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液を調製するための製剤；及び、
肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液から調製され、かつ再溶解により肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液を調製するための製剤
が提供される。

これらの HGF 凍結乾燥製剤は凍結乾燥時及び凍結乾燥後の長期保存に際しても HGF の重合体が生成せず、優れた安定性を有している。また、凍結乾燥製剤から調製された水溶液には凝集、白濁、ゲル化などの生成がなく、かつ該水溶液を保存した場合にも重合体が生成しにくいという特徴を有している。

通常、バイアル中に凍結乾燥製剤を調製するために用いられる水溶液と、得られた凍結乾燥製剤をバイアル中で溶解して調製される水溶液には、同濃度の有効成分が含まれることが望ましい。従って、本発明の製剤は、好ましくは HGF を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液をバイアル中又はアンプル中で凍結乾燥することにより製造できる。また、本発明の製剤は、凍結乾燥前及び／又は再溶解後の水溶液が注射剤として望ましい 5 から 6.5 の範囲の pH を有することが好ましく、さらに、本発明の製剤は、凍結乾燥前及び／又は再溶解後の水溶液が、注射剤として望ましい浸透圧、例えば、生体とほぼ等張又は注射剤の浸透圧比として許容される浸透圧比（1～2）を有することが好ましい。

本発明の好ましい態様によれば、安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、

グルタミン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、硫酸化多糖類、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤である上記HGF凍結乾燥製剤；安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる上記HGF凍結乾燥製剤；安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる上記HGF凍結乾燥製剤；安定化剤がアルギニン、リジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる上記HGF凍結乾燥製剤が提供される。これらの安定化剤は、好ましくは凍結乾燥時及び／又は凍結乾燥後の保存時におけるHGFの重合体生成を防止するのに十分な量で上記製剤中に配合される。

また、本発明の別の好ましい態様によれば、緩衝剤がリン酸塩である上記HGF凍結乾燥製剤；さらに界面活性剤を含有する上記HGF凍結乾燥製剤；界面活性剤が非イオン性界面活性剤である上記HGF凍結乾燥製剤；非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤である上記凍結乾燥製剤が提供される。

また、別の観点からは、HGFを5 mg/mL未満の濃度で含有する水溶液を凍結乾燥するために用いるHGFの安定化剤であって、アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、硫酸化多糖類、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤が本発明により提供される。好ましい安定化剤は、アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれ、特に好ましい安定化剤はアルギニン、リジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる。この安定化剤は、HGFを5 mg/mL未満の濃度で含有する水溶液の凍結乾燥時及び凍結乾燥後の保存時におけるHGFの重合体生成を防止することができる。

さらに、本発明により、上記安定化剤及び5 mg/mL未満の濃度のHGFを含有する水溶液を凍結乾燥して得ることができ、再溶解により5 mg/mL未満の濃度の

HGFを含有する水溶液を調製するためのHGF凍結乾燥製剤が提供される。上記の凍結乾燥製剤の好ましい製剤は、上記安定化剤（好ましくはアルギニン、リジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤）、5mg/mL未満の濃度のHGF、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する水溶液をバイアル中で凍結乾燥して得ることができる。

発明の実施するための最良の形態

本発明の凍結乾燥製剤に含まれるHGFの種類は特に限定されない。例えば、HGFを含有することが知られているヒトやラット等のほ乳動物由来の体液や組織、または自発的にHGFを産生する細胞から天然のHGFを単離してもよいが、遺伝子組換え法により該増殖因子cDNAを細胞に導入して得られる組換えHGFを用いてもよい。組換えHGFを産生させる宿主としては、大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。具体例には、組換えHGFとして、例えば、上記ほ乳動物由来の胎盤、肝障害患者肝組織及び血液、MRC-5細胞、IMR-9細胞などの線維芽細胞株、あるいは特開平3-285693号公報に記載された方法に従いhHGFをコードするcDNAを含む発現ベクターをCHO細胞等の宿主に導入した産生株などから得られたものを挙げができる。

また、HGFとしては、シグナル配列を有する蛋白質などの前駆体蛋白質や、肝実質細胞を増殖させる活性を損なわない範囲において一部のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は挿入した修飾蛋白質や糖類を欠失又は置換した改変体を用いてもよい。改変体としては、例えば、特開平2-288899号公報、W090/10651号公報、特開平3-130091号公報、同3-255096号公報、同4-30000号公報、Nature, 342, 440-443(1989)等に記載されたものを挙げができる。

本発明の凍結乾燥製剤に好適に用いられるHGFとして、以下の理化学的性質を有する蛋白性因子を挙げることができる。またHGFはヒト由来のものであることが好ましく、特に好ましいHGFとして、特開平3-72883号公報及び特開平

4-89499 号公報に記載のアミノ酸配列で表されるものを挙げることができる。

- 1) SDS-PAGE (非還元条件下) による推定分子量が約 76,000 ~ 92,000 である、
- 2) 肝実質細胞を増殖させる活性を有する、及び
- 3) ヘパリンに対して強い親和性を有する。

さらに、好ましい HGF は、上記の理化学的性質に加えて、

- 4) 80°C、10 分間の加熱処理により上記活性が失活する、及び
- 5) トリプシンによる消化処理及びキモトリプシンによる消化処理により上記活性が失活する、

を有する。

HGF、緩衝剤、及び塩化ナトリウムの 3 成分を含む HGF 凍結乾燥製剤（特開平 6-247872 号公報又は特開平 9-25241 号公報に記載のもの：HGF 濃度は 5 ~ 20 mg/mL）において、HGF の沈殿などの問題を回避するために HGF の含有量を低下させると、凍結乾燥工程において良好なケーキが得られないという問題があり、さらに、上記 3 成分から得られた凍結乾燥製剤を再溶解した水溶液では、凝集、白濁、ゲル化が認められ、十分な物理化学的安定性を達成できないという問題もある。従って、凍結乾燥により良好なケーキ形状を与え、かつ長期間の保存安定性に優れた水溶液を製造できる凍結乾燥製剤を調製するためには、ケーキ形成性および水溶液における保存安定性の改善を目的とした添加剤の添加が必須である。

本発明の凍結乾燥製剤は、HGF を 5 mg/mL 未満の濃度で含む水溶液から調製され、及び／又は凍結乾燥製剤から製造される水溶液が HGF を 5 mg/mL 未満の濃度で含むように調製される。好ましくは、凍結乾燥前及び／又は再溶解後の水溶液が、注射剤として望ましい pH と、生体とほぼ等張又は注射剤の浸透圧比として許容される浸透圧比（1 ~ 2）を有するように調製することができる。本発明の凍結乾燥製剤は、保存安定性に優れるという特徴を有している。また、凍結乾燥工程により良好な凍結乾燥ケーキを形成することができ、凍結乾燥製剤を再

溶解した水溶液では、凝集、白濁、ゲル化などの問題がなく、十分な物理化学的安定性を達成できるという特徴がある。さらに、臨床適用した場合には、所望の薬理作用を十分に発揮することができる。

安定化剤としては、アルギニン；リジン；ヒスチジン；グルタミン；プロリン；グルタミン酸；アスパラギン酸；ヘパリン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ケタラン硫酸、デキストラン硫酸等の硫酸化多糖類；およびこれらの薬理上許容される塩を挙げることができる。薬理上許容される塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩等を挙げができる。これら安定化剤は、二種類以上を組み合わせて用いてもよい。好ましい安定化剤としては、アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸等を挙げができる。これらのうち、アルギニン、リジン、ヒスチジン、又はこれらの組み合わせが特に好ましい。安定化剤の添加量は、HGFの保存安定性を達成できる量であれば特に制限はされないが、好ましくはHGFの重量に対して0.01～100倍の重量であり、特に好ましくは0.1～30倍の重量が挙げられる。

緩衝剤としては、凍結乾燥前及び再溶解後の水溶液のpHを調整し、HGFの溶解性を保つ作用を有するものであれば特に限定されないが、例えば、リン酸バッファー、クエン酸バッファー、酢酸バッファーなどを用いることができる。緩衝剤として、好ましくは、リン酸バッファーを用いることができ、特に好ましくはリン酸ナトリウムバッファーを用いることができる。緩衝剤の添加量は、例えば、再溶解後の水量に対して1～100 mM程度である。

塩化ナトリウムは、凍結乾燥前及び再溶解後の水溶液においてHGFの溶解性を向上させるが、必要以上に添加すると浸透圧を高めるので好ましくない。一般的には、生体と等張となるような浸透圧を達成できる量を添加すればよく、特に注射剤の浸透圧比として許容される浸透圧比1～2が好ましく、例えば再溶解後の水量に対して140 mMとすることが好ましい。

HGFは、中性pHにおいてHGFの等電点（pI = 7～8）と重なるために溶解度が急激に低下するという問題を有している。例えば、140 mM塩化ナトリウ

ムを含有する 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (P B S ; 室温) において pH 7.0 ~ 7.5 付近では 1.0 mg/mL 弱の低い溶解度を示すが、pH 5.0 付近では 5 mg/mL 以上の溶解度を示し、H G F の溶解度は低 pH 側で高くなる。また、塩化ナトリウム濃度 0.14 M では H G F の溶解度は 1 mg/mL 程度であり、0.3 M 以上とすると H G F は 5 mg/mL 以上の濃度で溶解する。従って、H G F の溶解度を上昇させるためには、pH を 5 以下の酸性条件とするか、あるいは塩化ナトリウム濃度を 0.3 M 以上に上げることも考えられる。本発明の製剤においては、凍結乾燥前及び／又は再溶解後の水溶液の pH を弱酸性領域、具体的には pH 4.0 ~ 6.5、好ましくは pH 5.0 ~ 6.5 に調整することが好ましい。このような pH 領域においては、重合体生成が抑制される。

本発明の H G F 凍結乾燥製剤には、さらに界面活性剤を添加することが望ましい。H G F は容器の材質であるガラスや樹脂などに吸着しやすく、特に低濃度においては H G F の容器への吸着は投与薬液中の薬物含量の低下につながる。界面活性剤を添加することによって、再溶解後の H G F の容器への吸着を防止することができる。界面活性剤としては、例えば、ポリソルベート 80、ポリソルベート 20、H C O -40、H C O -60、ブルロニック F-68、ポリエチレングリコール等の非イオン性界面活性剤を挙げることができ、これらを二種以上組み合わせて用いてもよい。界面活性剤として特に好ましくは、ポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤（ポリソルベート 80 等）を用いることができる。界面活性剤の添加量は、例えば、再溶解後の水重量に対して 0.001~2.0% の範囲である。

本発明の H G F 凍結乾燥製剤は、H G F を含有する水溶液を通常の方法で凍結乾燥することにより製造できる。例えば、H G F、安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を注射用蒸留水に溶解し、必要に応じて界面活性剤を添加した後、濾過滅菌してバイアル又はアンプル等の容器に分注して凍結乾燥することができる。本発明の H G F 凍結乾燥製剤は、製剤化に必要な他の添加剤、例えば、酸化防止剤、防腐剤、賦形剤、無痛化剤などを含んでいてもよい。凍結乾燥方法としては、例えば、（1）常圧下で冷却凍結する凍結過程、（2）溶質に拘束されない自由水

を減圧下で昇華乾燥する一次乾燥過程、(3)溶質固有の吸着水や結晶水を除去する2次乾燥過程の3つの単位操作による方法が挙げられるが(Pharm. Tech. Japan, 8(1), 75-87, 1992)、本発明の凍結乾燥製剤の製造方法はこの方法に限定されることはない。本発明の凍結乾燥製剤は、使用に際して、HGF濃度が5mg/mL未満となるように注射用蒸留水などの溶媒を加えて溶解すればよい。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

例1：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（比較例）

140 mM 塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mM リン酸緩衝液(pH6.5)にHGF 1 mg/mLとなるように溶解し、無菌濾過した後にHGF水溶液を得る。本水溶液のpHを調整した後に、無菌的にバイアル瓶に2 mLずつ充填し、表1に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得ることができる。なお、表中「→」は、温度を変化させることを示す。

表1

	凍結過程		一次乾燥過程		二次乾燥過程	
温度(°C)	20→	-40	-40	-40→	-20	-20
時間(Hr)	1		5	3	48	2
圧力(mmHg)	760		760	<1	<1	<1

例2：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（比較例）

140 mM 塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mM リン酸緩衝液(pH6.5)にHGF 5 mg/mLとなるように加温溶解し、無菌濾過した後にHGF水溶液を得る。本水溶液のpHを調整した後に、無菌的にバイアル瓶に2 mL

ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度 H G F 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 3：高濃度 H G F 凍結乾燥製剤の作製（比較例）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に H G F 10 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に H G F 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、高濃度 H G F 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 4：低濃度 H G F 凍結乾燥製剤の作製（比較例）

300 mM 塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM クエン酸緩衝液 (pH5.0) に H G F 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に H G F 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度 H G F 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 5：低濃度 H G F 凍結乾燥製剤の作製（比較例）

300 mM 塩化ナトリウム、5% グリシン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM クエン酸緩衝液 (pH5.0) に H G F 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に H G F 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度 H G F 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 6：低濃度 H G F 凍結乾燥製剤の作製（比較例）

300 mM 塩化ナトリウム、5% アラニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM クエン酸緩衝液 (pH5.0) に H G F 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過し

た後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 7：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニンを含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。この製剤は使用時に 2 mL の注射用蒸留水に溶解することにより HGF を 1 mg/mL 含有し、注射剤として許容される pH および浸透圧比 (1.5；ほぼ等張) を有する注射液とすることができる。

例 8：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 9：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 2 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 0 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 3 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 1 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 4 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 2 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（比較例）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 5 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 3 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8において、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 4：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8において、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH5.5) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 5：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8において、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH5.0) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 6：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8において、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.2) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 7：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8において、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 8：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8において、100 mM アルギニンの代わりに 50 mM アルギニンを用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 9：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8において、アルギニンの代わりにリジンを用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 0 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにヒスチジンを用いて、低濃度 H G F 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 1 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにグルタミンを用いて、低濃度 H G F 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 2 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにシステインを用いて、低濃度 H G F 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 3 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにプロリンを用いて、低濃度 H G F 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 4 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにグルタミン酸ナトリウムを用いて、低濃度 H G F 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 5 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにアスパラギン酸ナトリウムを用いて、低濃度 H G F 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 6 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにグリシンを用いて、低濃度 H G F 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例27：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、バイアル瓶への充填量2mLの代わりに5mLを用いて、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得ることができる。

例28：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)にデキストラン硫酸ナトリウム50 mg/mLおよびHGF1 mg/mLとなるように溶解し、無菌濾過した後にHGF水溶液を得る。本水溶液のpHを調整した後に、無菌的にバイアル瓶に2 mLずつ充填し、例1の凍結乾燥の条件と同様な条件により低濃度HGF凍結乾燥製剤を得ることができる。

試験例1：HGFの溶解度に関する評価

（1）HGFの溶解度の評価方法

HGFをポリプロピレン製チューブに秤量し、種々の濃度の塩化ナトリウムおよび安定化剤、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mM リン酸ナトリウム緩衝液を添加後、直ちにチューブを一定温度に24時間保持し、HGFを溶解した。溶解後直ちに遠心分離(15,000 rpm、10分間、一定温度)を行い、HGF飽和溶液と未溶解HGFを完全に分離し、上清をサンプリングした。低タンパク吸着性フィルター；ミリポアGV(親水性デュラポア；0.22 μm)で濾過し、得られた飽和溶液中のHGF濃度をHPLC法(ゲル濾過法)により定量し、HGFの飽和溶解度を求めた。

HPLCによる分析条件

カラム：TOSOH TSK G-3000SWXL(Φ0.78×30cm)

流速：0.3 mL/min

検出波長：OD 280nm

温度：30°C

キャリアー : 0.3 M NaCl, 50 mM Phosphate Na, 0.1% SDS, pH7.5

アプライ : 50 μ L

HGF の保持時間 : 24.0 min

(2) HGF の溶解度におよぼす pH の影響

140 mM 塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液で、pH の異なる溶液を調製し、4°C および 20°C における HGF の溶解度を (1) の方法で検討し、その結果を表 2 に示した。pH の低下に伴い、HGF の溶解度は徐々に増加し、pH 5.0 以下で顕著な溶解度の向上が確認された。また、いずれの場合も温度上昇に依存した溶解度の増加を認めた。

表 2

	20°C	4°C
pH 7.5	0.8	0.4
pH 7.0	1.8	1.0
pH 6.0	2.3	1.3
pH 5.0	5.9	4.2

(HGF の溶解度を mg/mL で示した)

(3) HGF の溶解度におよぼす塩化ナトリウム濃度の影響

種々の濃度の塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) を調製し、4°C および 20°C における HGF 溶解度を (1) の方法で検討し、その結果を表 3 に示した。塩化ナトリウム濃度を上昇させるにしたがって、HGF の顕著な溶解度の増加を認めた。また、いずれの場合にも、温度上昇に依存した HGF の溶解度の増加を認めた。

表3

	20°C	4°C
無添加	0.3	0.1
+ 140 mM NaCl	0.8	0.4
+ 230 mM NaCl	3.2	1.4
+ 300 mM NaCl	8.5	4.0
+ 900 mM NaCl	> 190	-

(HGFの溶解度を mg/mL で示した)

(4) HGF の溶解度におよぼす各種安定化剤の影響

各種医薬品添加剤のHGF溶解度におよぼす影響について検討した。種々の濃度の添加剤、140 mM 塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート 80 を含有する 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8~7.5) に、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、HGF水溶液を得た。96 穴マイクロタイタープレートに各ウェルあたり 200 μL ずつ分注し、4°Cにて 48 時間保存した後、プレートリーダーにて OD 450 nm を測定し HGF水溶液の濁度を求めた。HGFの溶解度が低下し、HGFが凝集・沈澱するにともない溶液の濁度が上昇した。

添加物として、L-アミノ酸 20 種類（アルギニン、リジン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウム、システイン、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、バリン）、糖類 7 種類（マンニトール、果糖、トレハロース、ブドウ糖、ソルビトル、ショ糖、乳糖）、高分子類 3 種類（デキストラン硫酸、デキストラン、PEG）、タンパク質類 3 種類（ヒト血清アルブミン、酸性ゼラチン、塩基性ゼラチン）、界面活性剤 3 種類（ポリソルベート 80、ポリソルベート 20、HCO-40、HCO-

60) について HGF の溶解度におよぼす影響を評価したところ、下記の物質に HGF の溶解度を保持する安定化作用が認められた。

①アミノ酸類；アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸ナトリウム、
アスパラギン酸ナトリウム、グルタミン、システイン、プロリン
(0.05 M で効果が確認された)

②多糖類；デキストラン硫酸 (0.1% で効果が確認された)

顕著な効果が認められたアミノ酸について、種々の濃度のアミノ酸、140 mM 塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を調製し、4°Cにおける HGF の溶解度を (1) の方法で検討し、その結果を表 4 に示した。

表 4

		飽和溶解度	浸透圧比
添加剤なし		1. 0	1. 0
+ L-A r g	5 0 mM	7. 3	1. 3
+ L-L y s	5 0 mM	4. 5	1. 3
+ L-H i s	5 0 mM	3. 2	1. 2
+ L-G l u N a	5 0 mM	2. 2	1. 3
+ L-A r g	1 0 0 mM	> 1 0	1. 6
+ L-L y s	1 0 0 mM	> 1 0	1. 6
+ L-H i s	1 0 0 mM	4. 8	1. 4
+ L-G l u N a	1 0 0 mM	3. 2	1. 6
(HGF の溶解度を mg/mL で示した)			

試験例 2

凍結乾燥前後の H G F 水溶液の性状

凍結乾燥過程における H G F の物理的安定性の変化を確認するため、凍結乾燥前の H G F 水溶液及び凍結乾燥後そのまま精製水で再溶解した H G F 水溶液を、4°C にて 24 時間保存後、溶解後の溶液の性状（濁り）を目視により観察した。凍結乾燥製剤の再溶解にかかる時間および浸透圧比についても評価した。その結果を表 5 に示す。

実施例 1 および 2 の製剤において、凍結乾燥製剤を再溶解した後に 4°C にて 24 時間保存することにより白濁したが、その他の実施例の製剤の性状に関しては安定であった。

表 5

製剤	凍結乾燥前の水溶液	再溶解後の水溶液	浸透圧比
実施例 1	白濁	瞬時、白濁	1.0
実施例 4	澄明	瞬時、澄明	2.0
実施例 5	澄明	溶けづらい、澄明	4.0
実施例 6	澄明	溶けづらい、澄明	3.9
実施例 8	澄明	瞬時、澄明	1.5
実施例 19	澄明	瞬時、澄明	1.6
実施例 20	澄明	瞬時、澄明	1.4
実施例 21	澄明	瞬時、澄明	1.3
実施例 22	澄明	溶けづらい、白濁	1.7
実施例 23	澄明	瞬時、澄明	1.3
実施例 24	澄明	瞬時、澄明	1.5
実施例 25	澄明	瞬時、澄明	1.5
実施例 26	澄明	瞬時、澄明	1.3
実施例 28	澄明	瞬時、澄明	1.3

試験例 3

凍結乾燥製剤溶解後の性状

実施例で作製した凍結乾燥製剤を、凍結乾燥直後および 25°C、40°C、50°C にて 1 ケ月間保存後、再溶解にかかる時間、再溶解後の溶液の性状（濁り）を評価した。凍結乾燥製剤の溶解は精製水で行い、室温にて性状を評価した。その結果を表 6 に示す。

25°C 保存において、実施例 22 の製剤において、凍結乾燥製剤を再溶解直後に白濁したが、その他のいずれの実施例の製剤も性状に関して安定であった。また、40°C および 50°C の保存においては、実施例 1, 22, 23, 24 および 25 の製

剤は溶解直後に白濁したが、その他のいずれの実施例の製剤も性状に関して安定であった。

表 6

製剤	1ヶ月保存品		
	25°C	40°C	50°C
実施例 1	瞬時、 澄明	瞬時、 白濁	瞬時、 白濁
実施例 4	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明
実施例 5	溶けづらい、 澄明	溶けづらい、 澄明	溶けづらい、 澄明
実施例 6	溶けづらい、 澄明	溶けづらい、 澄明	溶けづらい、 澄明
実施例 8	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明
実施例 19	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明
実施例 20	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明
実施例 21	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明
実施例 22	溶けづらい、 白濁	溶けづらい、 白濁	溶けづらい、 白濁
実施例 23	瞬時、 澄明	瞬時、 白濁	瞬時、 白濁
実施例 24	瞬時、 澄明	瞬時、 白濁	瞬時、 白濁
実施例 25	瞬時、 澄明	瞬時、 白濁	瞬時、 白濁
実施例 26	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明
実施例 28	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明	瞬時、 澄明

試験例 4

凍結乾燥製剤における重合体含量変化

実施例で作製した凍結乾燥製剤を、凍結乾燥直後（イニシャル）、および 25°C、40°C、50°C にて 1 ヶ月間保存し、その凍結乾燥製剤に含まれる重合体含量と HG F 含量の比を測定した。試験例 1（1）の方法（ゲルfiltration 法）を使用した。その

結果を表7および表8に示す。

重合体の保持時間 : 20.4 min, 21.8 min

H G F の保持時間 : 24.0 min

保存温度の上昇にともない重合体生成に増加傾向が観察されるものの、特に実施例8, 19および20の凍結乾燥製剤は重合体の生成は極端に少なく物理化学的に安定であった。アルギニン、リジンおよびヒスチジンを添加することにより、高温保存しても重合体の生成は少なく（重合体生成率：40°Cにおいて約3%以下、50°Cにおいて約5～9%以下）、保存安定性が向上することが判明した。また、比較例として、アルギニンを含まない点以外は同様な成分及び方法により調製されている実施例1の凍結乾燥製剤を用いて同様な試験を実施したが、保存温度の上昇に伴い重合体生成の大幅な増加が観察された。

また表8に示されるように、H G F濃度を低濃度化（5 mg/mL未満）することにより、重合体生成は促進され、保存安定性が低下することが示された。凍結乾燥製剤の安定化剤として特開平9-25411号公報に記載されたグリシンおよびアラニンを用いた場合には、高濃度H G F凍結乾燥製剤（特開平9-25411号公報の実施例5および6:20 mg/mL）に比べ、低濃度H G F凍結乾燥製剤（実施例5, 6および26:1 mg/mL）では重合体生成が促進され、保存安定性が低下することが判明した。

一方、凍結乾燥製剤の安定化剤としてアルギニン、リジンおよびヒスチジンを用いた実施例8, 19および20の凍結乾燥製剤は、低濃度H G F凍結乾燥製剤（1 mg/mL）でも重合体の生成が顕著に抑制され、保存安定性が向上することが示された。

表 7

製剤	イニシャル	1ヶ月保存品		
		25°C	40°C	50°C
実施例 1	0.48	5.50	24.27	40.63
実施例 4	0.35	0.48	3.80	11.24
実施例 5	0.31	0.69	4.40	9.58
実施例 6	0.30	0.54	3.20	9.53
実施例 8	0.30	0.11	0.18	0.60
実施例 19	0.31	0.16	1.74	4.48
実施例 20	0.31	0.18	0.28	0.88
実施例 21	0.31	0.54	2.77	16.89
実施例 22	—	—	—	—
実施例 23	0.32	0.31	3.24	11.24
実施例 24	0.32	2.19	4.90	6.39
実施例 25	0.34	1.11	4.80	7.73
実施例 26	0.36	0.33	6.21	22.66
実施例 28	2.74	3.48	13.30	32.87
実施例 1 *	1.07			6.17
実施例 5 *	0.92			4.09
実施例 6 *	0.93			2.90
実施例 9 *	1.78			14.01

* 特開平 9-25241 号公報の表 4 及び表 6 からの引用

表 8

製剤	50°Cで1ヶ月保存の凍結乾燥製剤 の重合体含量/HGF含量
[アミノ酸を含有しない製剤]	
実施例1 (HGF 1 mg/mL)	40.63
実施例4 (HGF 1 mg/mL)	11.24
実施例9* (HGF 10 mg/mL)	14.01
実施例1* (HGF 20 mg/mL)	6.17
[グリシンを含有する製剤]	
実施例5 (HGF 1 mg/mL)	9.58
実施例5* (HGF 20 mg/mL)	4.09
[アラニンを含有する製剤]	
実施例6 (HGF 1 mg/mL)	9.53
実施例6* (HGF 20 mg/mL)	2.90

* 特開平9-25241号公報の表4及び表6からの引用

試験例5

凍結乾燥製剤における重合体含量変化 - pHの重合体生成に与える影響

実施例8, 13, 14, 16及び17で調製した各種pHを有する凍結乾燥製剤を、凍結乾燥直後（イニシャル）および50°Cにて1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間保存した後に、その凍結乾燥製剤に含まれる重合体含量とHGF含量の比を測定した。試験例1(1)の方法（ゲル濾過法）を使用した。その結果を表9に示す。

重合体の保持時間；20.4 min, 21.8 min

HGFの保持時間；24.0 min

pH7.0 および 7.2 を有する実施例 1 6 および 1 7 の凍結乾燥製剤は、50°Cの保存において経時に重合体生成が増大するものの、pH6.5 以下の pH を有する実施例 8, 1 3 および 1 4 の製剤では重合体の生成は少なく、弱酸性の pH において安定性が向上することが判明した。

表 9

製剤	イニシャル	50°C保存品		
		1ヶ月保存	2ヶ月保存	3ヶ月保存
実施例 1 4 (pH5.5)	0.48	0.38	0.56	0.76
実施例 1 3 (pH6.0)	0.35	0.91	0.51	1.31
実施例 8 (pH6.5)	0.31	1.40	1.58	1.28
実施例 1 7 (pH7.0)	0.30	1.26	2.16	2.96
実施例 1 6 (pH7.2)	0.30	5.64	7.63	12.71

試験例 6

凍結乾燥製剤の生物活性変化（比活性）

実施例 1, 8 で作製した凍結乾燥製剤を、25°C、50°Cにて 2 ヶ月間保存、あるいは 10°C、25°Cにて 1.5 年間保存し、その凍結乾燥製剤を再溶解した水溶液の生物活性を、下記に示す生物活性測定方法で測定した。その結果を表 1 0 に示す。

生物活性測定方法

ヒト肝細胞株 PLC/PRF/5 を対数増殖期まで培養し、細胞生存率を確認後、 0.7×10^5 個/mL となるように細胞溶液を調製する。HGF サンプル及び標準品を添加した 96 穴アッセイプレートに細胞溶液を $100\mu\text{L}$ ずつ添加し、細胞数が 0.7×10^4 /ウェルとなるように播種した (n=4)。5%炭酸ガスインキュベータ内、37°C で 20 時間プレインキュベーション後、さらに、「 $^{3}\text{H}-\text{チミジン}$ 」を添加し、6 時

間培養を続けた。培養完了後、ファルマシア社ベータプレートシステムを使用して、細胞の回収し、細胞内に取り込まれた「³H】量を測定した。測定結果を平行線検定法にかけ、HGFサンプルの比活性を標準品の比活性で除し、力価(%)を求めた。

実施例8のアルギニンを添加した凍結乾燥製剤においては、高温保存しても生物活性に殆ど変化はなく、生物活性の面で安定であった。また、比較例として、アルギニンを含まない点以外は同様な成分及び方法により調製されている実施例1の凍結乾燥製剤を用いて同様な試験を実施したが、保存温度の上昇に伴い生物活性の大幅な低下が観察された。

表10

	2ヶ月保存品		1.5年保存品	
	25°C	50°C	10°C	25°C
実施例1	64.5%	10.2%	—	—
実施例8	87.1%	71.0%	72.6%	66.1%

産業上の利用可能性

本発明の凍結乾燥製剤は、臨床上有用な低濃度のHGFを含む水溶液を調製可能であり、凍結乾燥時及び凍結乾燥後の保存時に重合体の生成が少なく、安定性に優れている。また、凍結乾燥時に良好なケーキ形成性を有し、再溶解性に優れるという特徴を有しており、注射剤として望ましいpHおよび浸透圧比を有する製剤として調製することも可能である。

請求の範囲

1. 肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液から調製される製剤。
2. 肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、再溶解により肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液を調製するための製剤。
3. 肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液から調製され、かつ再溶解により肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液を調製するための製剤。
4. 安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、硫酸化多糖類、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤である請求の範囲第 1 項から第 3 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。
5. 安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる請求の範囲第 1 項から第 3 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。
6. 安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる請求の範囲第 1 項から第 3 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。
7. 緩衝剤がリン酸塩である請求の範囲第 1 項から第 6 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。
8. 凍結乾燥前の水溶液が注射剤として望ましい pH および浸透圧比を有する請

求の範囲第 1 項から第 7 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。

9. 再溶解後の水溶液が注射剤として望ましい pH および浸透圧比を有する請求の範囲第 1 項から第 7 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。

10. 凍結乾燥前の水溶液の pH が 5 ~ 6.5 の範囲である請求の範囲第 8 項又は第 9 項に記載の凍結乾燥製剤。

11. 再溶解後の水溶液の pH が 5 ~ 6.5 の範囲である請求の範囲第 8 項又は第 9 項に記載の凍結乾燥製剤。

12. さらに界面活性剤を含有する請求の範囲第 1 項から第 11 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。

13. 界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求の範囲第 12 項に記載の凍結乾燥製剤。

14. 非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤である請求の範囲第 13 項に記載の凍結乾燥製剤。

15. バイアル又はアンプル中に調製された請求の範囲第 1 項から第 14 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。

16. 凍結乾燥時及び／又は凍結乾燥後の保存時における HGF の重合体生成を防止するために十分な量の安定化剤を含む請求の範囲第 1 項から第 15 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。

17. HGF を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液を凍結乾燥するために用いる HGF の安定化剤であって、アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、硫酸化多糖類、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤。

18. 凍結乾燥時及び／又は凍結乾燥後の保存時における HGF の重合体生成を防止することができる請求の範囲第 17 項に記載の安定化剤。

19. 凍結乾燥時及び／又は凍結乾燥後の保存時における HGF の重合体生成を防止するために十分な量で用いられる請求の範囲第 17 項に記載の安定化剤。

20. アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、及び

これらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる請求の範囲第17項から第19項のいずれか1項に記載の安定化剤。

21. アルギニン、リジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる請求の範囲第17項から第19項のいずれか1項に記載の安定化剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP, 6-40938, A (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.), 15 February, 1994 (15.02.94), especially, page 3, left column, example 2 (Family: none) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), Columbus, OH, USA, DN.120:200456	1-4, 7-19 5, 6, 20, 21
A	EP, 456188, A1 (TOYOB0 CO., LTD.), 13 November, 1991 (13.11.91), the whole document, & JP, 4-18028, A	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 August, 2000 (25.08.00)

Date of mailing of the international search report
12 September, 2000 (12.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/03506

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' A61K38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' A61K38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	JP, 6-40938, A(住友製薬株式会社) 15. 2月. 1994(15. 02. 94) 特に、第3頁左欄 実施例2 (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), Columbus, OH, USA), DN. 120:200456	1-4, 7-19/ 5, 6, 20, 21
A	EP, 456188, A1(TOYOB0 CO., LTD.) 13. 11月. 1991(13. 11. 91) whole document, & JP, 4-18028, A	1-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 08. 00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

森井 隆信

4C 9455



電話番号 03-3581-1101 内線 3451